

## TRAITE DE OPERATION EN MATIERE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 25 avril 2001 (25.04.01)	
Demande internationale no PCT/EP00/06513	Référence du dossier du déposant ou du mandataire - Cas 1788PCT/GT
Date du dépôt international (jour/mois/année) 10 juillet 2000 (10.07.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 16 juillet 1999 (16.07.99)
Déposant SIGRIST, Hans	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

01 février 2001 (01.02.01)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé Nestor Santesso no de téléphone: (41-22) 338.83.38
--	---



**Translation**

**PATENT COOPERATION TREATY**

**PCT**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

(PCT Article 36 and Rule 70)

10/03/068

Applicant's or agent's file reference Cas 1788PCT/GT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/06513	International filing date (day/month/year) 10 July 2000 (10.07.00)	Priority date (day/month/year) 16 July 1999 (16.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68		
Applicant CENTRE SUISSE D'ELECTRONIQUE ET DE MICROTECHNIQUE S.A.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 01 February 2001 (01.02.01)	Date of completion of this report 11 September 2001 (11.09.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/06513

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

☒ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1-11, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

☒ the claims, Nos. 1-19, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

☒ the drawings, sheets/fig 1/2-2/2, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages \_\_\_\_\_

☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_

☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 00/06513

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

#### 1. Preamble

The three essential features of the invention appear to be (i) the fact that the monomers are added to the biotic environment, (ii) the measurement of a variation in a physical parameter at the surface of the sensor, and (iii) the arrangement of said surface. These features do not appear to be described in the prior art as cited in the search report. It should be noted that document **D1** (WO-A-97/27317) appears to describe a "catalytic amplification for overall detection" system (cf. D1, e.g. claim 44, and page 2, lines 13-18 of the present application). These three features appear to be present in claim 1 (cf. point 2 below), but not unequivocally so (cf. Box VIII).

2.1 Novelty: see point 1 above.

2.2 Inventive step: See the simple use of the system and the increase in the sensitivity threshold (cf. the present page 2, lines 26-29 as well as examples IV and V (pages 10-11)).





**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

Claim 1 appears to be unclear. The essential features of the invention are unequivocally described in claim 9 (the specific surface structure enabling variation in the physical parameter to be detected). In claim 1, said surface is characterised in terms of the expected result, admittedly with a reference to the measurement of variation in the physical parameter (line 8). In the characterising part of claim 1, the term "measurable" (line 13) appears to lack clarity in view of the expression "signal representative of variation in a physical parameter by hybridisation" (line 8).



# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT T3

REC'D 14 SEP 2001

PCT

## RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire Cas 1788PCT/GT	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/EP00/06513	Date du dépôt international (jour/mois/année) 10/07/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 16/07/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12Q1/68		
Déposant CSEM CENTRE SUISSE ....		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 4 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
  - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 01/02/2001	Date d'achèvement du présent rapport 11.09.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Cuendet, P N° de téléphone +49 89 2399 8690 



**I. Base du rapport**

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

**Description, pages:**

1-11                      version initiale

**Revendications, N°:**

1-19                      version initiale

**Dessins, feuilles:**

1/2-2/2                      version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :



**RAPPORT D'EXAMEN  
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/EP00/06513

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

*(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)*

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-19
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-19
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-19
	Non : Revendications

2. Citations et explications  
voir feuille séparée

**VIII. Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :  
voir feuille séparée





**1). Préambule**

Les trois caractéristiques essentielles de l'invention sembleraient être (i) le fait d'ajouter les monomères au milieu biotique (ii) la mesure d'une variation d'un paramètre physique au niveau de la surface du capteur (iii) l'agencement de cette surface. Ces caractéristiques ne semblent pas être indiquées dans l'art antérieur tel qu'indiqué dans le rapport de recherche. Notons que **D1: WO-A-97/27317** semblerait correspondre à un système du type "amplification catalytique pour une détection globale"; cf. D1, p.ex. revendication 44/présente demande page 2, lignes 13-18. Ces trois caractéristiques sembleraient figurer dans la revendication 1 (cf. au point V.2. ci-dessous) , mais, non sans équivoque (cf. au point VIII ci-dessous).

**2). Point V.2.**

2.1. Nouveauté: voir au point 1 ci-dessus.

2.2. Activité inventive: voir la mise en oeuvre simple du système et l'augmentation du seuil de sensibilité; cf. présente p.2, lignes 26-29 ainsi que les exemples IV. et V. (pp. 10-11).

**3). Point VIII.**

La revendication 1 semblerait manquer de clarté.

Dans la revendication 9 les caractéristiques essentielles de l'invention apparaissent sans équivoque (structure spécifique de la surface permettant la détection de la variation du paramètre physique). Dans la revendication 1 cette surface est caractérisée par le résultat escompté, en mentionnant, il est vrai, la mesure de la variation du paramètre physique (ligne 8); dans la partie caractérisante de la revendication 1 le terme "mesurable" (1 ligne 13) semblerait manquer de clarté au vu du terme "signal représentatif de la variation d'un paramètre physique par hybridation" (ligne 8).



## PCT

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>Cas 1788PCT/GT</b>	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° <b>PCT/EP 00/ 06513</b>	Date du dépôt international (jour/mois/année) <b>10/07/2000</b>	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) <b>16/07/1999</b>
Déposant  <b>CSEM CENTRE SUISSE ....</b>		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

**1. Base du rapport**

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

- b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ **Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche** (voir le cadre I).

3. ☐ **Il y a absence d'unité de l'invention** (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrégé est la Figure n°

☒ suggérée par le déposant.

☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

1c \_\_\_\_\_

☐ Aucune des figures n'est à publier.



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/EP 00/06513

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 97 27317 A (CHEE MARK ;LAI CHAOQIANG (US); LEE DANNY (US); AFFYMETRIX INC (US)) 31 juillet 1997 (1997-07-31) voir document en entiere, esp. revend. 43,44 et figure 20 ---	1-3
A	EP 0 669 395 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 30 août 1995 (1995-08-30) voir document en entiere, esp. claims 43,44 et figure 20 ---	1
A	WO 98 58079 A (HUDSON ROBERT H E ;DAMHA MASAD (CA); PIUNNO PAUL A (CA); UDDIN AND) 23 décembre 1998 (1998-12-23) voir Abrégé --- -/--	1,2,8-11

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

13 décembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

20/12/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Osborne, H



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/EP 00/06513

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>EP 0 886 141 A (SUISSE ELECTRONIQUE MICROTECH ; PRIONICS AG (CH)) 23 décembre 1998 (1998-12-23) revendication 1</p> <p>-----</p>	1,2,8-11





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/06513

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9727317 A	31-07-1997	AU 2253397 A EP 0880598 A	20-08-1997 02-12-1998
EP 0669395 A	30-08-1995	DE 4406524 A JP 2777550 B JP 7270425 A US 5573913 A	31-08-1995 16-07-1998 20-10-1995 12-11-1996
WO 9858079 A	23-12-1998	CA 2208165 A AU 7024498 A EP 0991777 A	18-12-1998 04-01-1999 12-04-2000
EP 0886141 A	23-12-1998	EP 0887645 A	30-12-1998



VERIFICATION OF TRANSLATION

---

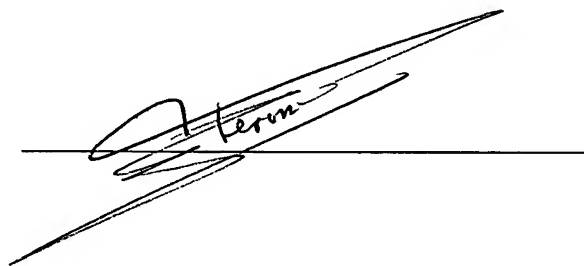
International Application PCT/EP 00/06513 of 10.07.2000

I, (Name and address of translator)

Gérard Thérond  
Esplanade 4  
2087 Cornaux  
Switzerland

am conversant in the English language and I state that the following is a true translation to the best of my knowledge and belief of the International Application PCT/EP 00/06513 dated July 10, 2000.

Signature of translator :

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'G. Thérond', is written over a horizontal line.

Dated : Marin, January 8, 2002



SYSTEME CAPTEUR BIOCHIMIQUE A SENSIBILITE ACCRUE  
PAR AMPLIFICATION MOLECULAIRE DU SIGNAL

La présente invention a pour objet un système capteur biochimique dont la sensibilité est accrue par une amplification moléculaire d'un signal initialisé par l'interaction entre une entité biochimique présente dans une solution ou un fluide biologique et un réactif immobilisé sur le substrat du capteur et ayant une affinité spécifique pour ladite entité biochimique.

En matière de capteurs biologiques, on recherche de plus en plus des systèmes qui permettent de faire encore reculer les limites de détection et de dosage d'entités biochimiques dans des fluides biotiques, dans l'espoir d'obtenir une très grande sensibilité de détection. A cet effet, les perfectionnements technologiques ont porté non seulement sur l'environnement instrumental, par exemple sur les limites de détection d'un signal, mais aussi sur la conception même du capteur dès lors qu'on avait atteint les limites de sophistication au niveau instrumental. Mais là encore, les perfectionnements au niveau du capteur ont atteint un seuil au delà duquel il n'est plus possible de détecter des biomolécules à l'état de traces, seuil qui est de l'ordre du nanomolaire (nM) ou du picomolaire (pM).

Néanmoins d'autres perfectionnements ont permis de rendre le signal d'un capteur, jusqu'alors indétectable par les technologies antérieures, mesurable grâce à une amplification du signal sur lequel repose le principe de détection. Une telle amplification trouve son application préférée dans le domaine des capteurs biologiques étant donné que les conditions mises en oeuvre dans l'analyse biologique sont compatibles avec les systèmes de bioamplification.

Actuellement, deux modes de bioamplification sont employés dans des systèmes destinés à détecter, par exemple, des réactions immunologiques. Selon un premier mode d'amplification, dans les tests ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assays), la molécule à détecter, par exemple un anticorps qui interagit avec une entité chimique tel qu'un antigène immobilisé, est chimiquement liée à une enzyme. L'enzyme sert à catalyser la transformation des molécules détectables. Dans les systèmes ELISA couramment utilisés, les enzymes qui catalysent la production d'entités chimiques sont presque toujours des hydrolases. Les produits de réaction solubles dans l'eau sont de préférence détectés dans l'ensemble du milieu réactionnel en mesurant l'absorption, la luminescence ou la bioluminescence.

Dans les biocapteurs, on obtient un deuxième mode d'amplification en augmentant le nombre ou la masse des espèces détectées. Ce principe d'amplification est réalisé par exemple en liant des marqueurs de masse à la molécule à détecter.

Si le principe de détection repose sur la fluorescence ou l'absorption, des molécules fluorescentes ou absorbantes sont chimiquement liées à l'entité chimique. A titre d'exemple d'amplification de ce type, on peut citer le brevet US 5,175,270 qui décrit un mécanisme d'amplification à partir d'une architecture dendrimère à la surface du capteur. La liaison de molécules modifiées sur chaque molécule cible, ou la liaison de réactifs secondaires marqués (par exemple des colloïdes, nanoparticules ou des anticorps secondaires marqués avec un fluorophore) produira une amplification linéaire du signal. Des billes de latex, des composés nanonocristallins semi-conducteurs ou de l'or colloïdal sont des marqueurs de masse couramment utilisés dans les systèmes biocapteurs. Dans des systèmes d'amplification commerciaux, des anticorps secondaires fortement marqués par des molécules fluorescentes contribuent à augmenter le signal linéairement.

En général, les systèmes usuels amplifient les signaux du capteur par des réactions catalysées par une enzyme qui augmente le nombre d'entités chimiques secondaires de l'ensemble par catalyse (amplification catalytique pour une détection globale). Autrement, on augmente les signaux du capteur soit en ajoutant de la masse, pour une détection sensible à la masse, soit en augmentant le nombre de molécules marquées qui sont liées à l'unité.

A titre d'exemple d'amplification linéaire à la surface d'un capteur, on peut citer l'amplification d'un signal de fluorescence : dans ce système les anticorps secondaires sont conjugués pour permettre la détection de cibles en faible quantité.

Ces deux modes d'amplification qui viennent brièvement d'être rappelés ont permis d'augmenter sensiblement, soit en solution soit sur une surface, la sensibilité de détection : ils ne permettent cependant pas d'obtenir un signal suffisamment élevé pour les rendre suffisamment utilisables dans la pratique.

La présente invention a donc pour but d'augmenter encore le seuil de sensibilité d'un capteur biochimique par une méthode d'amplification n'ayant pas les inconvénients de l'art antérieur, en étant en particulier plus simple à mettre en oeuvre et moins coûteuse.

A cet effet, l'invention a pour objet un capteur biochimique à amplification moléculaire d'un signal pour la détection et le dosage d'une entité biologique en milieu biotique, cette entité biologique pouvant comprendre des oligonucléotides, des peptides ou des polysaccharides. Le système d'amplification est caractérisé en ce qu'on ajoute au milieu biotique des composés monomères et des unités catalytiques capables de catalyser à partir de l'extrémité d'un brin élémentaire de l'entité biologique un enchaînement polymère à partir desdits composés monomères en augmentant ainsi localement un paramètre physique mesurable à la surface du capteur.

Les unités catalytiques sont des enzymes choisies parmi toutes les classes de transférase, polymérase et synthétase qu'il est possible d'utiliser, soit individuellement, c'est-à-dire en ne choisissant qu'une seule espèce d'enzyme, soit en choisissant plusieurs enzymes qu'on utilise en combinaison ou qu'on ajoute de façon séquentielle au milieu biotique.

Parmi les unités catalytiques préférées, on peut citer une transférase spécifique à l'ADN ou à l'ARN simple qui allonge le brin oligonucléotide.

Les composés monomères, qui sont ajoutés au milieu biotique pour augmenter localement la masse par polymérisation, sont choisis de préférence parmi les acides nucléiques : NTP ou dNTP; où N = A (Adénosine), C (Cytidine), G (Guanosine) ou T (Thymidine) et d = déoxy.

Les peptidases, utilisées sous des conditions qui favorisent la réaction inverse, permettent la synthèse de matériaux protéiniques. Lorsqu'on veut obtenir une augmentation locale de masse des hydrates de carbone par une addition séquentielle d'enzymes, on choisit de préférence des monosaccharides transférase.

Comme indiqué précédemment, la détection et le dosage d'une entité chimique en milieu biotique repose fondamentalement selon l'invention sur une augmentation d'un paramètre mesurable, tel que la masse, à la surface même du capteur.

Selon un premier mode de détection, la surface du capteur a un agencement en réseau ou en gradient de réseau permettant de détecter, par exemple par des moyens optiques dans le champ d'évanescence une variation de l'indice de réfraction résultant de la variation de masse à la surface capteur, cette variation étant en corrélation avec le dosage de l'entité biochimique.

Selon un deuxième mode de détection, les composés monomères ajoutés au milieu biotique sont marqués avec un chromophore ou un fluorophore, de sorte que le polymère formé va augmenter localement la densité de marquage et permettre d'effectuer une mesure de fluorescence corrélable avec le dosage de l'entité biochimique.

Ces deux modes de détection sont donnés à titre d'exemples, mais le système capteur selon l'invention est adaptable à tout autre type de biocapteur sensible à une augmentation d'un paramètre physique, telle la masse à sa surface.

Il est donc nécessaire de maintenir à la surface du capteur le brin élémentaire de l'entité élémentaire permettant, par exemple, l'accroissement de masse par polymérisation à partir de l'une de ses extrémités. A cet effet, le substrat subit un traitement approprié, expliqué plus en détail par la suite, qui permet d'immobiliser directement ou indirectement l'unité de détection.

L'immobilisation directe de l'unité de détection s'effectue par une interaction covalente ou non covalente avec l'entité chimique à détecter, ladite interaction pouvant être unidirectionnelle en étant par exemple établie par une des extrémités de la séquence de nucléotides.

- 5            Cette immobilisation peut également être réalisée en utilisant un agent de réticulation photopolymérisable.

             Lorsque l'immobilisation est effectuée de façon indirecte, on utilise une charpente moléculaire qui permet d'immobiliser un plus grand nombre d'unités de détection, ladite charpente moléculaire étant elle-même liée à la surface du biocapteur par une unité d'accrochage. De façon optimale, cette unité d'accrochage a une  
10            grande affinité pour interagir avec les molécules de détection. De telles interactions sont par exemple des interactions du type (premier anticorps)-(deuxième anticorps), comme c'est le cas dans les protocoles de test ELISA généralisés, ou des interactions de type ADN/ADN comme c'est le cas dans les dispositifs biocapteurs à base d'ADN.

- 15            De nombreuses structures peuvent être utilisées pour former la charpente moléculaire, parmi lesquelles on peut citer :

             - de petites entités moléculaires qui permettent au moins une double fonctionnalisation, tel qu'un agent de réticulation hétéro-bifonctionnel par exemple N-(m-(trifluorométhyl)diazirin-3yl)phényl)-4-maléimido-butyramide,

- 20            - un anticorps modifié avec un oligonucléotide ou un de ses fragments. La fraction hydrocarbonée et le domaine-clef des anticorps possèdent des groupes fonctionnels telles que des chaînes latérales carbohydrates et amino-acides qui respectivement facilitent l'addition d'oligonucléotides,

             - des dendrimères ADN de tailles appropriées, qui présentent un grand intérêt  
25            en raison de leur aptitude à de multiples fonctionnalisations pour les oligonucléotides spécifiques. Des extensions à brin unique de dendrimères ADN permettent de fixer des anticorps fonctionnalisés à l'aide d'oligonucléotides,

             - des colloïdes de métaux ou de composés nanocristallins semiconducteurs qui procurent les éléments essentiels pour une fonctionnalisation multiple.

- 30            L'unité d'accrochage qui établit une liaison sélective entre la charpente moléculaire et la molécule de détection est, dans un mode de réalisation préféré, formée par une partie d'une molécule identique à l'unité de détection, tel qu'un anticorps, ou par un fragment de celle-ci. Parmi les unités d'accrochage utilisables dans le cadre de la présente invention, on peut citer :

- 35            - toutes les classes d'immunoglobulines, la protéine A, la protéine G, la protéine fusionnée A-G,



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
25 janvier 2001 (25.01.2001)

PCT

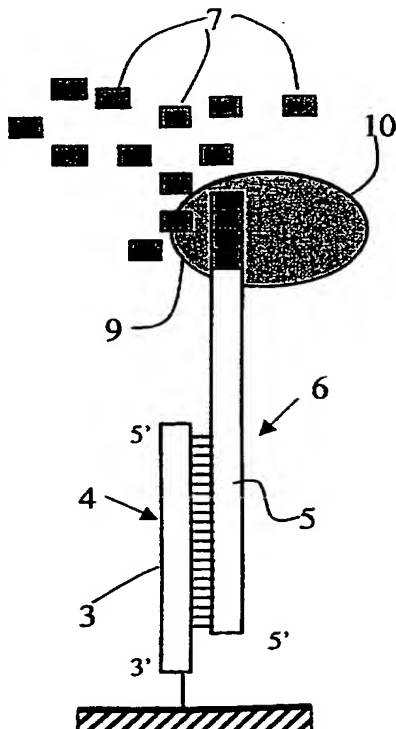
(10) Numéro de publication internationale  
WO 01/06002 A1

- (51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>: C12Q 1/68 (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US):  
CENTRE SUISSE D'ELECTRONIQUE ET DE  
(21) Numéro de la demande internationale: MICROTECHNIQUE S.A. [CH/CH]; Recherche et  
PCT/EP00/06513 Développement, Rue Jaquet-Droz 1, CH-2007 Neuchâtel  
(CH).  
(22) Date de dépôt international: 10 juillet 2000 (10.07.2000) (72) Inventeur; et  
(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement): SIGRIST,  
(25) Langue de dépôt: français Hans [CH/CH]; Im Holz 91, CH-3309 Kernenried (CH).  
(26) Langue de publication: français (74) Mandataire: INGENIEURS CONSEILS EN  
BREVETS S.A.; Rue des Sors 7, CH-2074 Marin  
(CH).  
(30) Données relatives à la priorité: 99/09258 16 juillet 1999 (16.07.1999) FR (81) État désigné (national): US.

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: BIOCHEMICAL SENSOR SYSTEM WITH INCREASED SENSITIVITY BY MOLECULAR AMPLIFICATION OF THE SIGNAL

(54) Titre: SYSTEM CAPTEUR BIOCHIMIQUE A SENSIBILITE ACCRUE PAR AMPLIFICATION MOLECULAIRE DU SIGNAL



(57) Abstract: The invention concerns a biochemical sensor system with molecular amplification of the signal for detecting and analysing a biological entity in a biotic medium, said biological entity being identifiable by at least an elementary strand comprising a nucleotide-specific sequence, said sensor having at its surface a detecting unit immobilised directly or indirectly, said detecting unit having a nucleotide sequence complementary to that of the biological entity and said sensor surface being arranged to deliver to the detecting and measuring means a signal representing the variation of a physical parameter by hybridizing the biological entity with the detecting unit. The invention is characterised in that it consists in adding to the biotic medium monomer compounds and catalytic units capable of catalysing from the elementary strand end of the biological entity a polymeric concatenation of said monomer compounds thereby locally increasing the mass physical parameter at the sensor surface.

(57) Abrégé: Système capteur biochimique à amplification moléculaire d'un signal pour la détection et le dosage d'une entité biologique en milieu biotique, ladite entité biologique étant identifiable par au moins un brin élémentaire comprenant une séquence spécifique de nucléotides, ledit capteur ayant à sa surface une unité de détection immobilisée directement ou indirectement, ladite unité de détection possédant une séquence de nucléotides complémentaire de celle de l'entité biologique et ladite surface du capteur étant agencée pour délivrer à des moyens de détection et de mesure un signal représentatif de la variation d'un paramètre physique par hybridation de l'entité biologique avec l'unité de détection, caractérisé en ce qu'on ajoute au milieu biotique des composés monomères et des unités catalytiques capables de catalyser à partir de l'extrémité d'un brin élémentaire de l'entité biologique un enchaînement polymère à partir desdits composés monomères en augmentant ainsi localement le paramètre physique de masse à la surface du capteur.

WO 01/06002 A1



(84) États désignés (régional): brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

**Publiée:**

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.

- l'avidine, la neutravidine, la streptavidine et des oligonucléotides qui occupent un quart des sites individuels de liaison biotine,

- une polyhistidine marquée,

- un nitrolo-tetraacétate marqué,

5 - n'importe quel genre d'interaction moléculaire à liaison spécifique mais non covalente.

En fonction des caractéristiques de la charpente moléculaire, et notamment lorsqu'elle a une architecture dendrimère, l'unité de liaison polymère peut être un oligonucléotide avec une séquence de nucléotides en partie complémentaire de l'une  
10 des branches d'un dendrimère.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans la description suivante faite en référence aux dessins annexés dans lesquels :

- les figures 1A, 1B et 1C représentent schématiquement les étapes conduisant à un premier mode de réalisation,

15 - la figure 2 est une représentation schématique d'un deuxième mode de réalisation, et

- les figures 3A et 3B montrent schématiquement un troisième mode de réalisation.

On va maintenant décrire un premier mode de réalisation d'un système  
20 capteur le plus simple selon l'invention, en référence aux figures 1A, 1B et 1C où on a schématiquement représenté les étapes permettant d'amplifier un signal.

La première étape (figure 1A) montre un capteur 1 à la surface 2 duquel est immobilisé un oligonucléotide 3 par son extrémité 3'. Cet oligonucléotide 3 est désigné plus généralement par "molécule de détection" 4. Cette immobilisation peut être  
25 effectuée, soit par un traitement approprié de la surface du capteur pour permettre l'établissement d'une liaison covalente avec l'extrémité 3' de l'oligonucléotide 3, soit par un procédé thermochimique ou encore par une technique de photo-immobilisation au moyen d'un agent de réticulation photopolymérisable, comme cela sera expliqué plus en détail dans les exemples qui suivent. Cette molécule de détection comporte  
30 une séquence de nucléotides spécifique qui va permettre par hybridation (figure 1B) d'immobiliser un brin élémentaire 5 de l'entité biochimique 6 à analyser, ce brin élémentaire ayant une séquence de nucléotides complémentaire de celle de la molécule de détection 4. Cette hybridation est effectuée en laissant libre l'extrémité 3' du brin élémentaire 5. Dans l'étape suivante (figure 1C), on a ajouté des nucléotides  
35 monomères 7, désignés par la suite par l'abréviation usuelle dNTP, et une enzyme 10, telle qu'une transférase à extrémité 3'. Cette enzyme 10 va catalyser spécifiquement la formation de liaisons covalentes entre l'extrémité 3' du brin élémentaire 5 et

successivement les nucléotides ajoutés au milieu pour créer un enchaînement polymère 9 qui va augmenter la masse totale à la surface, ce qui va se traduire par une variation mesurable de l'indice de réfraction. Dans le cas où les nucléotides ajoutés au milieu sont marqués avec un marqueur fluorescent, cette augmentation de  
5 masse va se traduire par une accumulation de nucléotides marqués à la surface du capteur et une diminution globale de la fluorescence du milieu.

En se référant maintenant à la figure 2, on a représenté schématiquement un système capteur selon l'invention correspondant à un mode d'amplification plus complexe, en ce que les oligonucléotides 3 sont indirectement liées à la surface 2 du  
10 capteur 1 par l'intermédiaire d'une charpente moléculaire 20 immobilisée à la surface du capteur par une unité d'accrochage 30. Dans l'exemple représenté, la charpente moléculaire 20 est formée par un colloïde bifonctionnalisé pour retenir à la fois les oligonucléotides 3 attachés par l'extrémité 5' et un fragment d'anticorps 31 complémentaire d'un antigène 32 immobilisé à la surface, l'anticorps 31 et l'antigène  
15 32 réalisant ensemble l'accrochage. Pour effectuer l'amplification du signal, on procède comme indiqué précédemment en ajoutant une enzyme 10 et des nucléotides 7.

La description ci-après donne en détail les différentes étapes qui permettent d'obtenir un système capteur biochimique selon l'invention et les modifications qu'il  
20 convient d'apporter à la surface d'un capteur optique du type de ceux qui reposent sur une détection de fluorescence ou sur une détection réfractométrique. Avec de petites modifications, les procédures décrites s'appliquent aussi à d'autres systèmes capteurs et à d'autres matériaux de transducteurs. Une modification de surface par silanisation convient aux surfaces qui donnent des groupes hydroxy de surface ou aux surfaces  
25 sur lesquels on peut produire des groupes hydroxy. D'une autre façon, on utilise aussi les technologies de photo-immobilisation pour fonctionnaliser une surface quand on souhaite avoir une fonctionnalisation de surface adressable et supprimer du milieu les liaisons non spécifiques de l'entité biologique. En principe, les matériaux employés pour le capteur sont des oxydes métalliques à la fois pour les mesures basées sur la  
30 réfractométrie et pour celles basées sur la fluorescence. Les modifications par charpente moléculaire amplificatrice ont été effectuées avec des colloïdes d'or et des dendrimères à plusieurs branches. Dans tous les exemples décrits ci-après, on a effectué l'amplification du signal avec la transférase à extrémité 3' (3'TT) pour catalyser l'addition de nucléotides à l'extrémité libre 3'.

I. Fonctionnalisation de la surface du capteur et immobilisation de l'unité de détection

Silanisation de la surface d'un oxyde métallique et liaison d'un oligonucléotide

5 En partant des protocoles de R. E. Kunz décrits dans les publications "Sensor and Actuators A (1997) 60,23" et "Sensors and Actuators B (1997) 38-39, 705", on a augmenté le nombre de radicaux hydroxy en traitant les capteurs optiques répliqués sur des polymères organiques avec un plasma d'oxygène dans un générateur de plasma. On a nettoyé les systèmes capteurs optiques sur verre par ultrasons dans  
10 l'acide nitrique 65% pendant trente minutes (30 mn), puis par rinçage à l'eau bidistillée. Les surfaces externes d'oxyde métallique ont été silanisées en phase vapeur avec du 3-(glycidyloxy) propoyl-triméthoxysilane pendant deux jours à 180°C et 10 mbar. On a enfin immobilisé sur les surfaces époxy ainsi obtenues, des oligonucléotides commerciaux à chaîne terminale 3' ou 5' amino préalablement  
15 dissous dans un tampon de phosphate de sodium dilué à 1/100.

Immobilisation d'oligonucléotides par l'intermédiaire de polymères photopolymérisables

20 Selon un protocole de photoimmobilisation de protéine décrit par H. Gao et al (Biotechnol. Appl. Biochem. (1994) 20, 251-263), la technique d'immobilisation adressable de biomolécules a été étendue à la liaison covalente d'oligonucléotides. Tout à la fois, le revêtement en couches et l'immobilisation en une seule étape se sont révélés applicables aux nucléotides. Au lieu d'utiliser de l'albumine de sérum bovin aryl diazirine modifié, on a employé à titre de nouveau réactif comme polymère  
25 photopolymérisable un dextrane aryl diazirine modifié. Un dextrane aryl diazirine modifié (T-Dextran) a été synthétisé par thiocarbamoylation de l' amino-dextrane avec la 3-(trifluorométhyl)-3-(m-isothiocyanophényl) diazirine. Pour la photoimmobilisation des oligonucléotides, on a préparé une solution contenant 20 nanomoles de T-Dextran et 10 nanomoles d'oligonucléotides en solution dans un milieu tampon à  
30 pH 7,4 (1,5 mM de NaCl et 0,05 mM de phosphate de sodium).

On a utilisé ce mélange pour imprimer par jet d'encre une surface de 10 mm<sup>2</sup>, ce qui correspond à une densité de 500 fmol/mm<sup>2</sup>, soit encore 5 nl pour une surface de 3 x 3 mm. Une fois ce dépôt effectué, on sèche les échantillons à température ambiante pendant 2 h à 20 mbar, puis on les expose à la lumière pour activer la  
35 réticulation du polymère. Cette immobilisation a été effectuée par une irradiation de trois minutes avec une source de lumière Orvel (11 mW/cm<sup>2</sup>) avec un filtre pour éliminer les radiations inférieures à 320 nm. Les surfaces modifiées sont lavées par

plusieurs solutions tampons et finalement cinq fois à l'eau bidistillée. Par un marquage isotopique, on a pu déterminer que 40% des oligonucléotides étaient immobilisés sur le capteur, ce qui correspond approximativement à une densité de 200 fmol/mm<sup>2</sup>.

## 5 Immobilisation orientée d'oligonucléotides

Pour avoir une immobilisation orientée d'oligonucléotides, on a préparé des substrats ayant à leur surface du nitrure de silicium, des polymères organiques, du diamant ou encore du DLC (Diamond-like Carbon). Les substrats de base, à l'exception des polymères organiques, sont lavés aux ultrasons successivement 5 mn  
10 chaque fois dans de l'hexane et dans de l'éthanol et séchés pendant deux heures à température ambiante à 6 mbar. On dépose ensuite avec une seringue une goutte d'une solution éthanolique 0,25 mM de l'agent de réticulation N-(m-(trifluorométhyl)diazirin-3yl)phényl)-4-maléimido-butyramide. Une goutte de 10 µl permet de couvrir une surface de 25 mm<sup>2</sup>. Après séchage de deux heures à  
15 température ambiante à 30 mbar, on effectue la photoimmobilisation en irradiant les échantillons pendant 20 mn avec une source lumineuse Stratalinker à 350 nm procurant une irradiation de 0,9 mW/cm<sup>2</sup>. On lave ensuite les surfaces modifiées trois fois avec de l'hexane et de l'éthanol; dans le cas d'un polymère organique utilisé comme substrat, on utilise le méthanol comme produit de lavage. Pour obtenir une  
20 immobilisation covalente, on dissout 10 nmol de 5'thio-oligonucléotide dans 50 µl d'une solution tampon dégazée à pH 7,7 (0,2 M HEPES + 1 mM EDTA). Cette solution est ensuite déposée par pipettage sur la surface maléimide modifiée et mise à incuber pendant seize heures à température ambiante. En dernier lieu, comme expliqué plus loin, on rince la surface oligonucléotide modifiée avec la solution tampon  
25 d'hybridation.

## II. Préparation de la charpente moléculaire

### Fonctionnalisation de colloïdes d'or avec des oligonucléotides et des fragments d'anticorps F(ab')

30 On effectue la sédimentation de colloïdes d'or de 20 nm de diamètre (10'000 tours/mn, pendant 30 mn) puis on élimine le surnageant et on ajoute une solution contenant 0,7 nmol de 5'thio-oligonucléotides et 0,3 nmol de fragments F(ab') fraîchement préparés dissous dans 50 µl d'une solution tampon dégazée à pH 7,7  
35 (0,2 M HEPES + 1 mM EDTA). On garde la solution seize heures à température ambiante et on lave les colloïdes modifiés en effectuant trois cycles de sédimentation et de remise en suspension dans un tampon de phosphate de sodium.

### Charpente moléculaire de tri et multidentates d'ADN

Avec une structure ADN tridentée, on a un ADN à deux extrémités 3'OH et pour la première génération de dendrimère avec cinq extrémités 3'OH.

- 5 L'architecture dendrimère de cette charpente moléculaire a été préparée comme indiqué dans les brevets de la société Polyprobe (US 5,175,270; US 5,484,904; US 5,487,973). On a sélectionné des séquences d'oligonucléotides ADN en tenant compte d'une liaison efficace du brin complémentaire. On a assemblé (figure 3A) une structure dendrimère de base 41 en laissant libres les deux extrémités 3' pour l'amplification 3'TT, une extrémité 5' étant complémentaire de la molécule de  
10 détection immobilisée à la surface. Cet assemblage moléculaire permet de dupliquer le nombre de sites d'extension 3'TT. Les charpentes moléculaires de dendrimères de première génération ont été conçues de façon analogue. L'addition d'un dendrimère tétradenté (40) et d'un deuxième étage aux dendrimères tridentés (41) et bidentés  
15 (42) a porté le nombre de sites d'extension 3'TT à cinq (figure 3B).

### III. Hybridation de brins de ADN complémentaires et réaction de transférase à extrémité 3'

#### 20 Hybridation des oligonucléotides d'ADN avec les molécules de détection immobilisées à la surface

- On a effectué la réaction d'hybridation avec les molécules de détection immobilisée à la surface, c'est-à-dire avec 15 à 60 nucléotides. Après immobilisation des molécules ADN de détection, on a lavé les surfaces trois fois avec une solution de  
25 5xSSC contenant 0,1% en poids de dodecylsulfate de sodium pour éliminer les oligonucléotides adsorbés de façon non covalente. On a ensuite dissous des brins élémentaires d'ADN à chaîne unique dans 250 ml d'une solution d'hybridation comprenant en poids 1% de caséine, 0,1% de sel sodique de lauroylsarcosine et 0,02% de dodecylsulfate de sodium dans une solution tampon de 5xSSC.

- 30 La solution ainsi obtenue a été déposée à la surface du capteur et on a laissé incuber deux heures à 45°C. Après l'étape d'hybridation, on a lavé les surfaces deux fois avec 2 x SSC contenant du dodécylsulfate de sodium à 0,1% en poids à température ambiante et trois fois avec une solution tampon 5 x SSG, contenant du dodecylsulfate de sodium à 0,1% en poids, chauffée à 50°C. Ces opérations de  
35 lavage intensif incorporant des détergents sont nécessaires pour éliminer les brins élémentaires non hybridés.

### Réaction de la transférase à extrémité 3'(réaction 3'TT)

Dans l'étape suivante, on a ajouté aux brins élémentaires hybridés des nucléotides, ayant ou non un marqueur fluorescent, en même temps que l'enzyme 3'TT. Cette enzyme catalyse la liaison des nucléotides avec le brin élémentaire. En  
5 ajoutant des monomères aux brins élémentaires, l'enzyme augmente l'indice de réfraction pour la détection de masse ou la fluorescence à la surface du biocapteur. On a d'abord lavé la surface du capteur deux fois avec 200 µl du tampon cacodylate à pH 7 (0,5 M cacodylate, 5 mM CoCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol). On a fait démarrer la  
10 réaction en ajoutant deux unités de 3'TT à un milieu d'incubation composé de 20 µl de tampon cacodylate, 100 µl d'un déoxynucléotide phosphate (dNTP), 4 µl de 5 mM de dCTP et 100 µl d'eau. Le mélange a été brièvement mélangé par aspiration avec une pipette et déposé sur le substrat.

Les modifications d'indice de réfraction à la surface du capteur ont été suivies soit de façon optique avec un capteur optique intégré, soit par une détection de  
15 fluorescence. On a quantifié l'amplification du signal en effectuant la différence entre le signal le plus élevé obtenu d'une surface ayant le brin élémentaire immobilisé, et le signal provenant d'un capteur de référence dans lequel le brin élémentaire n'a subi aucune hybridation.

## 20 IV. Amplification du signal dans un test génétique

### Test de détection de l'amplification du signal de fluorescence

Dans ce test, des molécules de détection d'ADN ont été immobilisées à la surface du capteur par photo-immobilisation à base de dextrane et hybridées avec les  
25 oligonucléotides qui sont, soit un composé témoin synthétique soit un oligonucléotide provenant de PCR. Dans le milieu réactionnel 3'TT, il y a des "dCTP" et des nucléotides fluorescents ChromaTide BODIPY FL-14-dCTP (Molecular Probes, Eugene Oregon, USA). On a initié la réaction d'amplification en ajoutant deux unités de 3'TT et on l'a arrêté après cinq minutes en lavant la surface du capteur avec la  
30 solution tampon de la réaction. On a suivi l'augmentation de fluorescence à la surface et comparé les résultats avec la fluorescence après hybridation d'une molécule de détection marquée à la fluoresceine.

Dans une deuxième série d'expériences, on a hybridé l'oligonucléotide à la fois  
à la branche de liaison de la première génération de dendrimères et à la molécule de  
35 détection liée à la surface. Avec cette configuration, la réaction 3'TT a lieu avec cinq extrémités 3' disponibles sur la charpente moléculaire.



On a enregistré l'incorporation des composés dCTP fluorescents. Les résultats expérimentaux montrent que le signal est augmenté d'un facteur 3,8 comparativement à celui d'un biocapteur agencé sans dendrimères.

5 V. Amplification du signal 3'TT dans des tests immunologiques

On a examiné la liaison d'un anticorps à un antigène photoimmobilisé en utilisant la détection optique intégrée sans marqueur telle que décrite par H. Gao et al (Biosensors and Bioelectronics (1995) 10, 317-328). On a effectué le test avec un anticorps non modifié et, dans une deuxième série d'expériences, avec un anticorps fonctionnalisé avec un oligonucléotide. On a effectué la fonctionnalisation de l'anticorps comme indiqué par Ghosh et al (Bio-conjugate. Chem. (1990) 1,71-76). L'amplification du signal secondaire par la réaction 3'TT a été effectuée à la fois pour les deux systèmes de tests. Le milieu réactionnel comprenait des "dCTP" et deux unités de l'enzyme 3'TT. On a suivi en fonction du temps l'augmentation de masse en observant les modifications de l'indice de réfraction. La vitesse initiale de réaction et le niveau de saturation se sont révélés 64 fois plus grands avec l'échantillon comprenant l'anticorps modifié par les oligonucléotides qu'avec l'échantillon sans oligonucléotides.

On a atteint une augmentation d'un facteur 150 pour la sensibilité de détection d'une entité biologique avec une charpente moléculaire à colloïdes d'or bifonctionnalisée en ayant à sa surface à la fois des fragments d'anticorps spécifiques d'un antigène et des oligonucléotides. On a utilisé cet agencement moléculaire pour amplifier le signal d'un biocapteur immunologique. Comme décrit ci-dessus, on a modifié des particules d'or colloïdal de 10 nmoles avec des oligonucléotides et des fragments F(ab') dans une proportion de 7/3. On a ensuite appliqué à la surface du biocapteur ces colloïdes d'or bifonctionnalisés en même temps que deux unités 3'TT et on a enregistré l'augmentation de masse en fonction du temps. Le déterminant antigénique du fragment F(ab') immobilisé sur le colloïde s'oriente vers un épitope d'anticorps du test ELISA. L'amplification du signal en fonction de la masse a été obtenu d'abord au moyen d'une liaison sélective des colloïdes substitués.

L'augmentation de la chaîne d'oligonucléotides provoquée par la réaction 3'TT conduit à une très forte augmentation du signal. Cela conduit finalement à l'amplification à saturation 150 fois supérieure à celle d'un échantillon sans colloïde.

## REVENDEICATIONS

1. Système capteur biochimique à amplification moléculaire d'un signal pour la détection et le dosage d'une entité biologique en milieu biotique, ladite entité biologique étant identifiable par au moins un brin élémentaire comprenant une séquence spécifique de nucléotides, ledit capteur ayant à sa surface une unité de  
5 détection immobilisée directement ou indirectement, ladite unité de détection possédant une séquence de nucléotides complémentaire de celle de l'entité biologique et ladite surface du capteur étant agencée pour délivrer à des moyens de détection et de mesure un signal représentatif de la variation d'un paramètre physique par hybridation de l'entité biologique avec l'unité de détection, caractérisé en ce qu'on  
10 ajoute au milieu biotique des composés monomères et des unités catalytiques capables de catalyser à partir de l'extrémité d'un brin élémentaire de l'entité biologique un enchaînement polymère à partir desdits composés monomères en augmentant ainsi localement un paramètre physique mesurable à la surface du capteur.

2. Système capteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit  
15 paramètre physique mesurable est la masse, l'absorption d'une onde lumineuse ou l'émission d'un signal de fluorescence.

3. Système capteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que les unités catalytiques sont des enzymes choisies parmi les transférases, les polymérases et les synthétases.

20 4. Système capteur selon la revendication 3, caractérisé en ce que les enzymes sont ajoutées au milieu biotique en choisissant une seule espèce, en combinant plusieurs espèces, ou en ajoutant séquentiellement plusieurs espèces.

5. Système capteur selon les revendications 3 ou 4, caractérisé en ce que l'enzyme est une transférase à brin ADN, telle qu'une transférase à extrémité 3', ou  
25 une polymérase à brin ARN.

6. Système capteur selon les revendications 3 ou 4, caractérisé en ce que l'entité biologique est un peptide ou une protéine et en ce que l'enzyme est une synthétase peptidée.

7. Système capteur selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'entité  
30 biologique est un di-ou oligo-saccharide et en ce que les enzymes ajoutées de façon séquentielle comprennent une mono- ou oligo-saccharide transférase.

8. Système capteur selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les composés monomères sont choisis parmi les nucléotides et les oligonucléotides

9. Système capteur selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la surface du capteur a un agencement en réseau ou en gradient de réseau permettant une détection optique de la variation de l'indice de réfraction, liée à la variation de masse à la surface du capteur, cette variation d'indice de réfraction étant corrélable avec le dosage de l'entité biochimique.
10. Système capteur selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que les composés monomères sont marqués avec un chromophore ou un fluorophore permettant d'effectuer une mesure d'absorption ou de fluorescence corrélable avec le dosage de l'entité biochimique.
11. Système capteur selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que la séquence de nucléotides formant l'unité de détection est directement liée à la surface du capteur par liaison covalente.
12. Système capteur selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'unité de détection est liée de façon unidirectionnelle par son extrémité 3' ou 5'.
13. Système capteur selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que la séquence de nucléotide formant l'unité de détection est liée à la surface du capteur par photo-immobilisation.
14. Système capteur selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que la séquence de nucléotides formant l'unité de détection est indirectement liée à la surface du capteur par une charpente moléculaire bifonctionnelle, elle-même liée à ladite surface par une unité d'accrochage.
15. Système capteur selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que les composés permettant de former la charpente moléculaire sont choisis parmi, une entité moléculaire bifonctionnelle, tel qu'un agent de réticulation hétérobifonctionnel, un anticorps modifié par un nucléotide ou l'un de ses fragments, des dendrimères ADN de taille appropriée, et des colloïdes de métaux ou de composés nanocristallins semiconducteurs.
16. Système capteur selon la revendication 14, caractérisé en ce que les composés permettant de former l'unité d'accrochage sont choisis parmi les immunoglobulines, la protéine A, la protéine G, et la protéine fusionnée A-G.
17. Système capteur selon la revendication 14, caractérisé en ce que les composés permettant de former l'unité d'accrochage sont choisis parmi l'avidine, la neutravidine, la streptavidine et des oligonucléotides ADN ou ARN occupant un quart des sites de liaison biotine.
18. Système capteur selon la revendication 14, caractérisé en ce que les composés permettant de former l'unité d'accrochage sont choisis parmi une polyhistidine marquée et un nitroloacétate marqué.

19. Système capteur selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'unité d'accrochage est formée par un oligonucléotide ayant une séquence de nucléotides partiellement complémentaire de l'une des branches d'un dendrimère lorsque la charpente moléculaire a une architecture dendrimère.

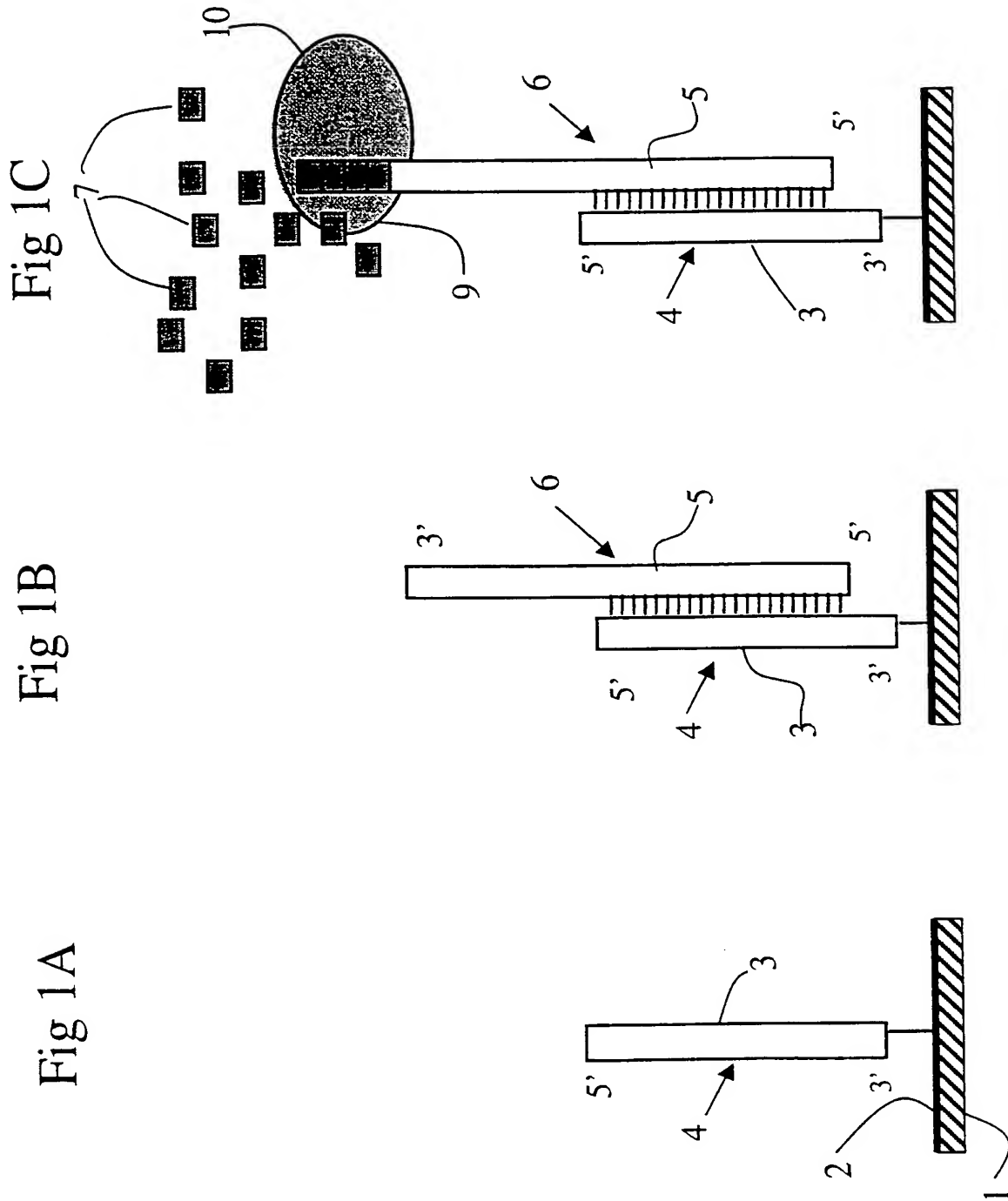




Fig 2

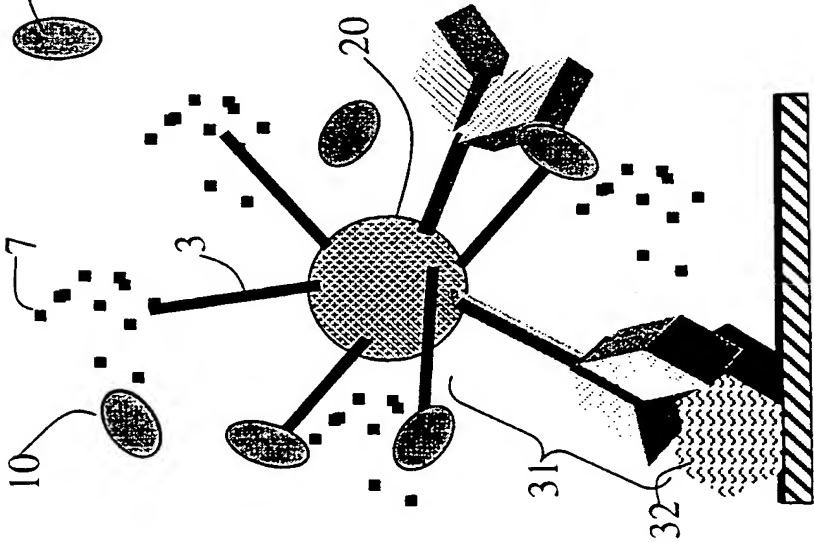


Fig 3A

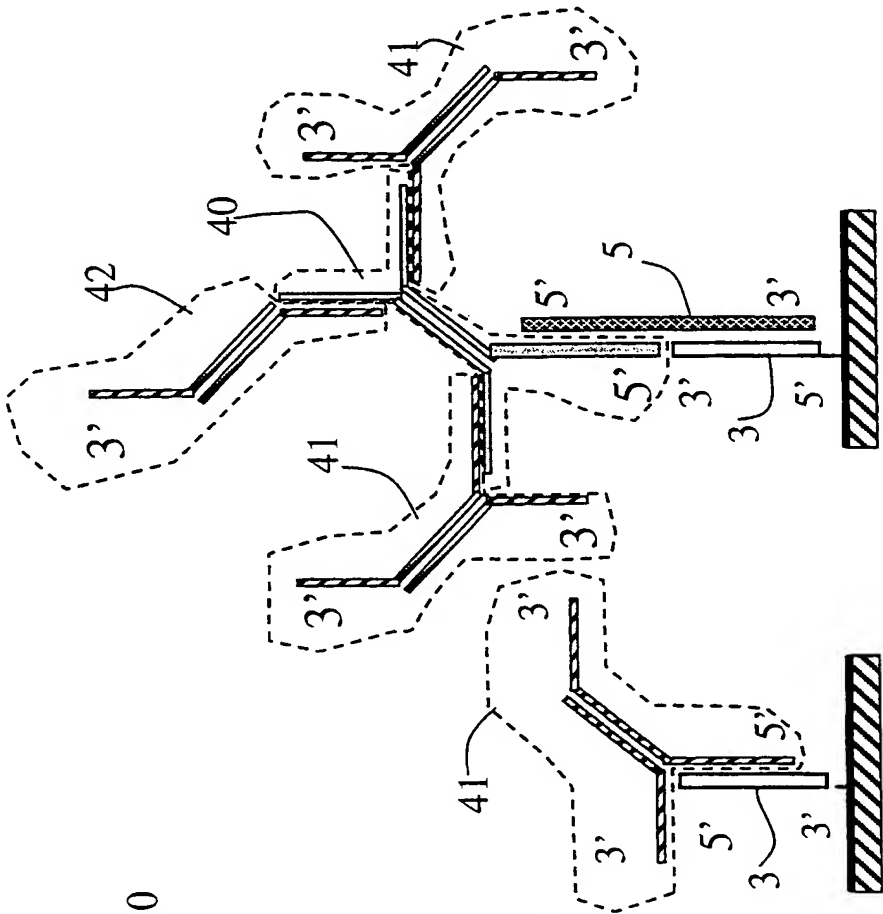
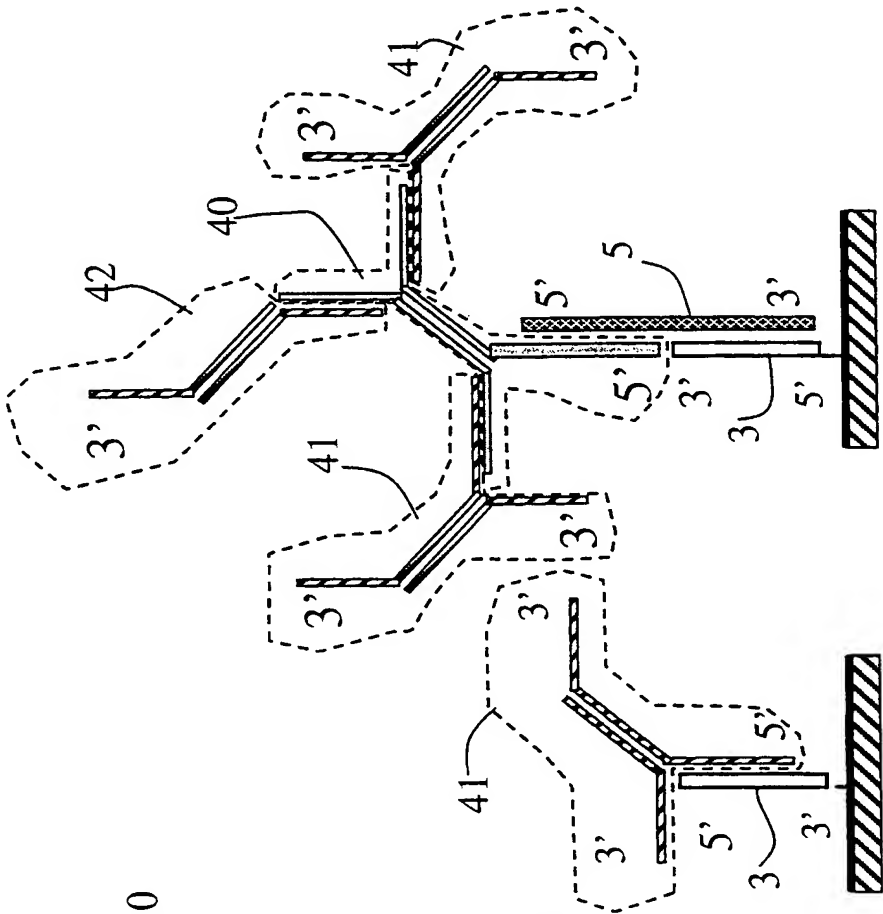


Fig 3B







# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No  
PCT/EP 00/06513

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)  
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.:
X	WO 97 27317 A (CHEE MARK ;LAI CHAOQIANG (US); LEE DANNY (US); AFFYMETRIX INC (US)) 31 July 1997 (1997-07-31) See the whole document , esp. claims. 43,44 and figure 20	1-3
A	EP 0 669 395 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 30 August 1995 (1995-08-30) see the wole document , esp .claims 43, 44 and figure 20	1
A	WO 98 58079 A (HUDSON ROBERT H E ;DAMHA MASAD (CA); PIUNNO PAUL A (CA); UDDIN AND) 23 December 1998 (1998-12-23) see abstract	1,2,8-11
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 December 2000

Date of mailing of the international search report

20/12/2000

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Osborne, H

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/06513

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>EP 0 886 141 A (SUISSE ELECTRONIQUE MICROTECH ;PRIONICS AG (CH)) 23 December 1998 (1998-12-23) claim 1</p> <p>-----</p>	1,2,8-11

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Application No

PCT/EP 00/06513

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9727317 A	31-07-1997	AU 2253397 A EP 0880598 A	20-08-1997 02-12-1998
EP 0669395 A	30-08-1995	DE 4406524 A JP 2777550 B JP 7270425 A US 5573913 A	31-08-1995 16-07-1998 20-10-1995 12-11-1996
WO 9858079 A	23-12-1998	CA 2208165 A AU 7024498 A EP 0991777 A	18-12-1998 04-01-1999 12-04-2000
EP 0886141 A	23-12-1998	EP 0887645 A	30-12-1998



1

2

3

4

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema.  nationale No  
PCT/EP 00/06513

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

### B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A ÉTÉ FAITE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)  
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		no. des revendications visées
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	
X	WO 97 27317 A (CHEE MARK ;LAI CHAOQIANG (US); LEE DANNY (US); AFFYMETRIX INC (US)) 31 juillet 1997 (1997-07-31) voir document en entire, esp. revend. 43,44 et figure 20 ---	1-3
A	EP 0 669 395 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 30 août 1995 (1995-08-30) voir document en entire, esp. claims 43,44 et figure 20 ---	1
A	WO 98 58079 A (HUDSON ROBERT H E ;DAMHA MASAD (CA); PIUNNO PAUL A (CA); UDDIN AND) 23 décembre 1998 (1998-12-23) voir Abrégé ---	1,2,8-11
	---	
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'inven tion revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'inven tion revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*G\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

13 décembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

20/12/2000

Norm et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Osborne, H

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema Internationale No

PCT/EP 00/06513

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
-----------	--	-------------------------------

A	EP 0 886 141 A (SUISSE ELECTRONIQUE MICROTECH ; PRIONICS AG (CH)) 23 décembre 1998 (1998-12-23) revendication 1 -----	1,2,8-11
---	---	----------

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dema internationale No

PCT/EP 00/06513

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9727317 A	31-07-1997	AU 2253397 A EP 0880598 A	20-08-1997 02-12-1998
EP 0669395 A	30-08-1995	DE 4406524 A JP 2777550 B JP 7270425 A US 5573913 A	31-08-1995 16-07-1998 20-10-1995 12-11-1996
WO 9858079 A	23-12-1998	CA 2208165 A AU 7024498 A EP 0991777 A	18-12-1998 04-01-1999 12-04-2000
EP 0886141 A	23-12-1998	EP 0887645 A	30-12-1998



1

1